

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOCIÊNCIAS

MARIA FERNANDA CORDEIRO ARRUDA

AVALIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DE BIOFILMES DE CANDIDA ALBICANS FORMADOS NA PRESENÇA DE DIMETILSULFÓXIDO

CURITIBA 2017

MARIA FERNANDA CORDEIRO ARRUDA

AVALIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DE BIOFILMES DE CANDIDA ALBICANS FORMADOS NA PRESENÇA DE DIMETILSULFÓXIDO

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração Biociências, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para defesa pública e obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa Co-orientador: Prof. Dr. Silas Granatto Villas-Boas

CURITIBA 2017 Dados da Catalogação na Publicação Pontifícia Universidade Católica do Paraná Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR Biblioteca Central

Arruda, Maria Fernanda Cordeiro A779a Avaliação do perfil metabólico de biofilmes de candida albicans formados 2017 na presença de dimetilsulfóxido / Maria Fernanda Cordeiro Arruda ; orientador: Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa ; co-orientador: Silas Granatto Villas-Boas. - 2017. 50 f. : il. ; 30 cm Tese (doutorado) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2017 Bibliografia: f. 38-50 1. Odontologia. 2. Dimetil sulfóxido. 3. Biofime. 4. Candida albicans. 5. Metabôlomica. Rosa, Edvaldo Antonio Ribeiro. II. Villas-Boas, Silas Granatto. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título. CDD 20. ed. - 617.6



Pontifícia Universidade Católica do Paraná Escola de Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação em Odontologia

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIA FERNANDA CORDEIRO ARRUDA

AVALIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DE BIOFILMES DE CANDIDA ALBICANS FORMADOS NA PRESENÇA DE DIMETILSULFÓXIDO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontificia Universidado Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Litulo de Doutor em Odontologia, Área de Concentração em Biociências.

Orientador (a):

Prof. Drz:Eğvalığo Antônio Ribeiro Rosa Programe de Bés Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Paulo Hentique Couic Souza Programa de Pós-Graduação em Ocontologia, PUCPR

ProP Dr Aline Cristina Batista Rodrigues Johann Programa de Pús-Qaduação em Odoritologia, PUCPR

<u>hand hara</u> Proff Dreads Marie Trindade (Awgio Hardy Estados Unidos, TISA

Prof[®] D? Patricia Maria Stuep Campelo

Curso de Farmánia, PUCPR

Curitiba, 25 de setembro de 2017.

Rua imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho - CEP 30215901 - Curitiba - Paraná - Brasil Tel.: (41) 3271 1637 Fone/Fax: (41) 3271 1405 She: www.puopnbr Email: ppgo@puopnbr

.

Aos meus queridos filhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu esposo Marcelo e ao meu filho Benjamin, pelo imenso apoio e incentivo, e por toda alegria que trazem à minha vida.

Aos meus pais Soeli e Thiophilo, que sempre estiveram ao meu lado, me auxiliando e confiando nos meus trajetos e apoiando meus projetos, pelo amor.

Às minhas irmãs Ana e Alice, e minha afilhada Anna, pelo carinho e amizade.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, pelos ensinamentos, pela amizade e confiança e por ter tornado essa pesquisa possível.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Silas Granatto Villas-Boas, pelos ensinamentos, pela amizade e receptividade.

A MSc Rosimeire Takaki Rosa, pelo grande auxílio com as pesquisas e pela amizade.

À Profa. Dra. Patrícia Maria Stuelp Campelo, pelo auxílio, pelos ensinamentos e pela amizade.

À Universidade de Auckland e seus funcionários e pesquisadores, pela receptividade e confiança.

À CAPES pelas bolsas concedidas.

Aos colegas de trabalho Ninna Granucci, Ting-Li Han e Luiz Fernando Bianchini, pelo auxílio na execução dessa pesquisa e pela amizade.

Aos parceiros e colaboradores que ajudaram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos que contribuíram direta ou indiretamente à realização de mais um sonho.

3

"Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente estruído de valores, que não possa ensinar algo ao seu irmão."

São Francisco de Assis

RESUMO

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente polar amplamente empregado como agente crioprotetor e como substância transportadora, principalmente como veículo de fármacos, utilizado em uma grande variedade de testes farmacológicos. No entanto, algumas pesquisas já relataram alterações celulares induzidas pelo DMSO, como a inibição do tubo germinativo em Candida albicans e o aumento do estresse oxidativo em Saccharomyces cerevisiae. Portanto, essa pesquisa teve o objetivo de avaliar o impacto do DMSO no metabolismo de C. albicans, especialmente em relação ao metabolismo central do carbono. Biofilmes de C. albicans SC5314 foram cultivados em discos de papel em um sistema dinâmico com fluxo contínuo de meio mineral mínimo (MM) em duas condições experimentais: controle e tratado com DMSO 0,02% (v/v). Após 72 h de incubação (37 °C), os biofilmes foram coletados e os metabólitos foram extraídos por ciclos de congelamento/descongelamento combinados com uma solução de metanol e água. Os metabólitos extraídos foram submetidos à derivatização com cloroformiato de metila (MCF) e foram posteriormente analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-EM). O experimento foi conduzido em três replicatas biológicas e cinco replicatas técnicas. Foram identificados 88 compostos, dos quais 27 foram considerados com diferença estatisticamente significante entre os grupos controle e tratado. No grupo tratado foi observado o aumento de alguns metabólitos intracelulares como putrescina e glutationa e redução de outros como metionina e lisina. Além disso, 13 vias daquelas envolvidas no metabolismo celular primário e secundário foram alteradas, das quais 7 foram down-reguladas e 6 foram upreguladas pelo DMSO 0,02% (v/v). Estes resultados mostram uma diferença considerável no perfil metabólico intracelular entre os biofilmes não tratados e tratados com DMSO, indicando a interferência do mesmo nas vias metabólicas de C. albicans. Dessa forma, o estudo sugere que testes laboratoriais podem ter seus resultados influenciados pelo solvente e a ação positiva de fármacos, por exemplo, pode não ser traduzida para a prática clínica.

Palavras-chave: Biofilme, *Candida albicans*, dimetilsulfóxido, vias metabólicas, metabolômica.

ABSTRACT

The dimethyl sulfoxide (DMSO) is a polar solvent widely employed as cryoprotective agent and carrier substance, mainly as a drug vehicle, which is used in a number of pharmacological testing. Nevertheless, some research already reported cellular changes induced by DMSO, such as, inhibition of germ tube in Candida albicans and increased oxidative stress in Saccharomyces cerevisiae. Therefore, this research had the objective to evaluate the impact of DMSO on the metabolism of C. albicans, especially directed to the central carbon metabolism. C. albicans SC5314 biofilms were grown on paper discs in a dynamic system with continuous flow of minimal mineral culture medium (MM) in two experimental conditions: control and treated with DMSO 0.02% (v/v). After 72 h of incubation (37 °C), the biofilms were quenched and metabolites were extracted by freeze-thaw cycles combined to a solution of cold The extracted metabolites were methanol-water. derivatized with methyl chloroformate (MCF) and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Three biological and five technical replicates were used in this experiment. Were identified 88 compounds, among those 27 were considered with statistically significant difference between control and treated group. For the treated group was observed intracellular upregulation of some metabolites as putrescine and glutathione and downregulation of others as methionine and lysine. In addition, 13 pathways of those involved in primary and secondary cell metabolism were altered, of which 7 were downregulated and 6 were upregulated by DMSO 0,02% (v/v). These results show a considerable difference in the intracellular metabolic profile between the untreated and DMSO treated biofilms, indicating its interference in the metabolic pathways of *C. albicans*. Thus, the study suggests that laboratory tests may have solvent-influenced outcomes and positive drug action, for example, may not be translated into clinical practice.

Key-words: Biofilm, *Candida albicans*, dimethyl sulfoxide, metabolic pathways, metabolomics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Análise dos componentes principais (PCA) de metabólitos intracelulares de C. albicans SC5314 para grupos controle (azul) e DMSO (vermelho). 17 FIGURA 2. Médias das abundâncias relativas (até 1,4) dos metabólitos intracelulares de C. albicans SC5314, que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os grupos controle e DMSO. FIGURA 3. Médias das abundâncias relativas (até 14) dos metabólitos intracelulares de C. albicans SC5314, que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os grupos controle e DMSO. 20 FIGURA 4. Médias das abundâncias relativas (até 250) dos metabólitos intracelulares de C. albicans SC5314, que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os grupos controle e DMSO. 10,13-DMTDA = Ácido 10,13-dimetiltetradecanóico. 21 FIGURA 5. Vias metabólicas com atividade alterada ($p \le 0.05$) pela presença do DMSO 0,02% (v/v) em amostras de biofilmes de C. albicans SC5314. Vias com escore de atividade (EA) inferior a 0 representam aquelas down-reguladas pelo DMSO e vias com EA superior a 0 representam FIGURA 6. Rede metabólica das vias e dos metabólitos intracelulares de

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metabólitos intracelulares identificados em biofilmes maduros de <i>C. albicans</i> SC5314 nos grupos experimentais controle e tratado com DMSO 0,02% (v/v).	18
Tabela 2. Metabólitos intracelulares de biofilmes maduros de <i>C. albicans</i> SC5314, alterados pelo DMSO 0,02% (v/v)	19
Tabela 3. Vias metabólicas com atividade alterada pela presença de DMSO $0,02\%$ (v/v) em amostras de biofilmes de <i>C. albicans</i> SC5314.	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

10,13- DMTDA	Ácido 10,13-dimetiltetradecanóico		
a.m.u	Unified atomic mass unit (unidade unificada de massa atômica)		
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico		
AMDIS	Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (Sistema Automatizado de Deconvolução e Identificação de Espectros de Massas)		
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas		
CoQ9	Ubiquinona 9 ou Coenzima Q9		
DBP	Dibutilftalato		
DMS	Dimetil sulfeto		
DMSO	Dimetilsulfóxido		
DO ₆₀₀	Densidade ótica a 600 nanômetros		
EA	Escore de atividade		
EROs	Espécies reativas do oxigênio		
eV	Elétron-volt		
GABA	Ácido γ-aminobutírico		
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Enciclopédia Quioto de Genes e Genomas)		
MCF	Methyl chloroformate (cloroformiato de metila)		
MM	Meio mineral mínimo		
Na_2SO_4	Sulfato de sódio		
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio		
NaOH	Hidróxido de sódio		
P ₄ O ₁₀	Pentóxido de fósforo		

- PAPi Pathway Activity Profiling (Perfil de Atividade de Vias)
- PCA Principal Component Analysis (Análise dos Componentes Principais)
- PDH Piruvato desidrogenase
- PEBR Paper-embedded biofilm reactor (reator para crescimento de biofilmes em papel)
- TCA *Tricarboxylic acid* (ácidos tricarboxílicos)
- YPD Yeast-peptone-dextrose (levedura-peptona-dextrose)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1	Cepa de Candida albicans	13
2.2	Preparo dos inóculos	13
2.3	Grupos experimentais	13
2.4	Formação de biofilmes aeróbios sob fluxo contínuo	13
2.5	Obtenção dos metabólitos intracelulares	14
2.5.1	Amostragem e fixação do metabolismo celular (quenching)	14
2.5.2	Extração e concentração dos metabólitos intracelulares	14
2.5.3	Quantificação da biomassa de células	15
2.5.4	Derivatização MCF	15
2.5.5	Cromatografia gasosa e espectrometria de massas	16
2.6	Tratamento e análise dos dados e análise estatística	16
3	RESULTADOS	17
4	DISCUSSÃO	25
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
6	REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

Infecções hospitalares causadas por *Candida* spp atingem a marca dos 46 mil casos por ano nos Estados Unidos, com 220 mortes, representando para o país uma despesa de milhões de dólares anuais (CDC, 2013). A espécie *C. albicans* é a mais importante do gênero sendo o agente causal de infecções sistêmicas graves de difícil tratamento, devido à sua capacidade de formar biofilmes e de desenvolver resistência aos fármacos empregados (PFALLER & DIEKEMA, 2007; CDC, 2013; LOW et al., 2016). Assim, a espécie consiste em um alvo importante na investigação e validação de novos medicamentos, bem como na elucidação dos mecanismos celulares responsáveis pelos fenômenos de resistência, virulência e de suceptibilidade aos antifúngicos já conhecidos para todo o gênero (KABIR et al., 2012).

Para garantia da reprodutibilidade experimental da е segurança farmacológica, as substâncias antifúngicas convencionais, em sua grande maioria hidrofóbicas, necessitam de solvente de baixa toxicidade, altamente polar e aprótico na condução dos testes de validação (CLSI, 2008). Portador de tais características, dimetilsulfóxido (DMSO) é amplamente empregado em 0 microbiologia, especialmente na dissolução de antifúngicos, onde a concentração final indicada é de até 1% v/v (EUCAST, 2003; CLSI, 2008); e na criopreservação de células, em concentrações de cerca de 10% v/v (SIGMA-ALDRICH, 2016).

O emprego laboratorial do DMSO data da década de 1950 (BRAYTON, 1986) e, apesar de seu vasto uso, sua ação sobre células de levedura ainda não é totalmente compreendida, principalmente no que diz respeito ao seu efeito sobre o metaboloma celular.

Quanto ao interesse em se avaliar o comportamento celular frente a um novo fármaco, a metabolômica é uma ferramenta pós-genômica que vem auxiliando na compreensão dos fenômenos metabólicos intra e extracelulares, o que facilita a predição da resposta metabólica à substância de interesse (VILLAS-BOAS & GOMBERT, 2006). Assim, o objetivo deste estudo foi utilizar a metabolômica para avaliar o comportamento metabólico de biofilmes de *C. albicans* na presença e ausência do DMSO.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepa de Candida albicans

Foi utilizada a cepa *Candida albicans* SC5314 (GILLUM *et al.*, 1984), mantida em ágar extrato de levedura-peptona-dextrose (YPD, pH 7) a 32 °C.

2.2 Preparo dos inóculos

Para o preparo dos inóculos, uma colônia de *C. albicans* foi selecionada, passada para o meio mineral mínimo (MM, pH 6,5) (VERDUYN *et al*, 1992, adaptado) e mantida sob agitação de 125 rpm, por 18 h (fase exponencial), a 30 °C, na ausência ou presença de DMSO a 0,02% (v/v). Então, a DO₆₀₀ foi determinada e ajustada para 1,0 (*ca.* 3 x 10^7 células.mL⁻¹). As células foram lavadas e ressuspendidas.

2.3 Grupos experimentais

Foram delineados dois grupos experimentais: a) grupo controle (**controle**), o qual recebeu apenas meio de cultura e as amostras foram denominadas D1, D2, D3, D4, D5, E1, E2, E3, E4, E5, I1, I2, I3, I4 e I5; e b) grupo tratado (**DMSO**), cujo sistema foi irrigado com meio de cultura contendo DMSO 0,02% (v/v) e as amostras foram denominadas J1, J2, J3, J4, J5, K1, K2, K3, K4, K5, L1, L2, L3, L4 e L5. Cada grupo consistiu em cinco replicatas técnicas e em três replicatas biológicas.

2.4 Formação de biofilmes aeróbios sob fluxo contínuo

Discos de papel para antibiograma (8 discos/amostra) foram secos a 60 °C por 24 h e mantidos em dessecador com P_4O_{10} , sob vácuo, *overnight*. Os discos tiveram suas massas determinadas e foram autoclavados. Cada grupo experimental consistiu em 8 discos. Alíquotas de 10 µL das suspensões de *C. albicans* SC5314 foram inoculadas nos discos, os quais foram inseridos em um reator para crescimento de biofilme em papel (PEBR) descrito por Selow et al. (2015). Os discos

foram irrigados por gotejamento com meio MM, na ausência ou presença de DMSO 0,02% (v/v), conforme o grupo experimental. Foi estabelecido um fluxo contínuo, com vazão de 30 mL.h⁻¹, por 72 h a 37 °C. Cada experimento possuiu uma amostra denominada "branco", onde os discos não foram inoculados com células.

2.5 Obtenção dos metabólitos intracelulares

A pesquisa do metaboloma foi feita conforme protocolo descrito por Smart et al. (2010), com adaptações. Todo o processo para obtenção dos metabólitos intracelulares (*fingerprint*) foi cuidadosamente realizado sob baixas temperaturas e banho de gelo para minimizar a perda ou descaracterização das substâncias pelo calor.

2.5.1 Amostragem e fixação do metabolismo celular (quenching)

Decorrido o tempo de incubação, os discos contendo biofilmes maduros de *C. albicans* (8 discos por amostra) foram colhidos e rapidamente inseridos em tubos Nalgene[®] contendo metanol 50% v/v gelado. Alíquotas de 20 μ L do padrão interno *d4*-alanina (2,3,3,3-*d*₄-alanina) foram adicionadas a cada amostra. Os tubos foram tampados e mantidos em banho gelado (-23 °C) de etanol por 5 min. Então, foram agitados em vórtex por 1 min e acondicionados a -80 °C por 30 min.

2.5.2 Extração e concentração dos metabólitos intracelulares

Para o rompimento das membranas celulares e extração dos metabólitos, três ciclos de congelamento e descongelamento foram conduzidos, onde as amostras foram descongeladas em banho de gelo por 5 min, agitadas em vórtex por 1 min e congeladas novamente a -80 °C por 40 min. Ao final dos três ciclos, as amostras foram centrifugadas (-20 °C, 30600 x g, 20 min). Os sobrenadantes foram coletados e mantidos a -80 °C. Os precipitados contendo restos celulares e discos foram então ressuspendidos em metanol 70% v/v gelado, agitados em vórtex por 1 min e centrifugados (-20 °C, 30600 x g, 20 min). Os sobrenadantes foram coletados,

adicionados aos anteriores, acrescidos de 20 mL de água Milli-Q[®] gelada (4 °C), congelados (-80 °C), liofilizados (-83 °C) e armazenados (-80 °C).

2.5.3 Quantificação da biomassa de células

A quantificação da biomassa foi realizada ressuspendendo-se cada amostra contendo o precipitado de restos celulares e discos em 10 mL de água destilada e agitando-a em vórtex. Esse material foi filtrado e lavado utilizando sistema de filtração Millipore[®] com membranas filtrantes (0,22 μ m) previamente secas a 60 °C por 24 h, e mantidas em dessecador contendo P₄O₁₀, sob vácuo, *overnight*. As membranas tiveram suas massas determinadas. Os resíduos remanescentes, juntamente com suas respectivas membranas filtrantes, foram dessecados como descrito acima. Os valores de biomassa foram determinados conforme a equação 1 (onde M=massa):

 $Biomassa = M_{1}(residuo \ celular + discos + membrana) - M_{0}(discos + membrana)$ Equação 1

2.5.4 Derivatização MCF

O método de derivatização com MCF provoca reações de alquilação, convertendo aminoácidos e ácidos carboxílicos em carbamatos e ésteres voláteis, permitindo a identificação dos metabólitos celulares primários, incluindo a maioria dos intermediários do metabolismo central do carbono.

As amostras liofilizadas foram ressupendidas em 200 µL de NaOH (1M) com o auxílio de vórtex. As soluções foram transferidas para tubos silanizados e foram adicionados 167 µL de metanol e 34 µL de piridina em cada tubo. Uma a uma, as amostras foram posicionadas sobre o vórtex e sistematicamente foram adicionados 20 µL de MCF. Após 30 s foram adicionados mais 20 µL de MCF, e após mais 30 s foram adicionados 400 µL de clorofórmio. Então as amostras permaneceram mais 10 s sob agitação. Foram acrescentados 400 µL de NaHCO₃ (50 mM), e os tubos foram agitados em vórtex por 10 s. As amostras foram centrifugadas por 3 min a 1500 x g. As fases aquosas foram removidas e foram adicionados 100 mg de Na₂SO₄ anidro às fases clorofórmicas para a remoção de quaisquer resquícios remanescentes de água. As amostras foram transferidas para vials para cromatografia a gás.

2.5.5 Cromatografia gasosa e espectrometria de massas

Para a separação e análise dos metabólitos derivados do MCF foi utilizada cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-EM), realizadas em sistema Shimadzu[®] GCMS-QP2010, equipado com detector de massa quadrupolo seletivo em modo de operação de impacto eletrônico (70 eV). Foi utilizada uma coluna ZB1701 (Zebron, Phenomenex[®]), de 30 m x 250 µm x 0,15 µm. A espectrometria de massas foi operada em modo *scan* (início após 4,5 min, alcance de massa 40-650 amu a 0,15 s/scan). Os parâmetros para separação e análise dos produtos derivados do MCF estão descritos em Smart et al. (2010).

2.6 Tratamento e análise dos dados e análise estatística

A identificação das substâncias presentes nas amostras foi baseada nos espectros de massa e tempos de retenção gerados pelo CG-EM, utilizando o programa AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*) em comparação com a biblioteca de espectros de massas fornecida pela Universidade de Auckland (Nova Zelândia). A abundância relativa dos metabólitos identificados foi determinada pelo programa ChemStation (Agilent[®]).

Após a identificação, os dados brutos foram normalizados pelo padrão interno d4-alanina, pelo branco e pela biomassa. Compostos de baixa abundância foram removidos. Utilizando o programa estatístico R, foi aplicado o teste t ($p \le 0.05$) e a análise dos componentes principais (PCA) para a identificação e remoção de outliers. Então, foi empregada a análise PAPi (Pathway Activity Profiling) (AGGIO et al., 2010) seguida do teste t ($p \le 0.05$) e PCA para a previsão das vias metabólicas envolvidas, as quais foram avaliadas com o auxílio das bases de dados on-line KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, http://www.kegg.com), BioCyc (http://biocyc.org/) е CGD (Candida Genome Database, http://www.candidagenome.org/).

3. RESULTADOS

Utilizando análises em CG-EM foram obtidos os espectros de massa das substâncias presentes e suas respectivas abundâncias relativas, nas amostras intracelulares de biofilmes de *C. albicans* SC5314, na ausência ou presença de DMSO 0,02% (v/v) e após a aplicação do teste PCA, as amostras se arranjaram em grupo controle (azul) e grupo DMSO (vermelho), em função das abundâncias das substâncias presentes (Figura 1).



FIGURA 1. Análise dos componentes principais (PCA) de metabólitos intracelulares de *C. albicans* SC5314 para grupos controle (azul) e DMSO (vermelho).

Foram identificados 88 metabólitos intracelulares provenientes de biofilmes de *C. albicans* SC5314 (Tabela 1), dos quais 27 apresentaram abundâncias estatisticamente diferentes ($p \le 0,05$) entre os grupos controle e DMSO (Tabela 2). Desses, 8 metabólitos se apresentaram reduzidos e 19 se apresentaram mais abundantes em amostras contendo DMSO 0,02% (v/v) (Figuras 2-4). Não foram detectadas alterações quantitativas de biomassa entre os grupos avaliados. Tabela 1. Metabólitos intracelulares identificados em biofilmes maduros de *C. albicans* SC5314 nos grupos experimentais controle e tratado com DMSO 0,02% (v/v).

Classificação	Metabólitos (88)		
Aminoácidos e suas isoformas	Alanina, asparagina, ácido aspártico, beta-alanina, cisteína, ácido glutâmico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina metionina, ornitina, norvaline, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina		
Derivados de aminoácidos	Creatinina, cistationina, ácido N-acetilglutâmico, putrescina, ácido piroglutâmico, S-adenosilmetionina		
Intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA)	Ácido α-cetoglutárico, ácido α-cetobutírico, ácido cis-aconítico, ácido císraconítico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido isocítrico, ácido málico, ácido succínico		
Ácidos graxos	Ácido 10,13-dimetiltetradecanóico (10,13-DMTDA), ácido 9-heptadecenóico, ácido adípico, ácido eicosanóico, ácido caprinóico, ácido caprílico, ácido decanóico, ácido docosanóico, ácido dodecanóico, ácido gama-linoleico, ácido hexanóico, ácido linoleico, ácido mirístico, ácido palmitelaídico, ácido pentadecanóico, ácido esteárico, ácido trans- vacênico		
Intermediários glicolíticos	Ácido 2-fosfoenolpirúvico, ácido pirúvico		
Cofatores e vitaminas	Ácido γ-aminobutírico (GABA), ácido dehidroascórbico, glutationa, NADP/NADPH, nicotinamida, ácido nicotínico		
Outros	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), ácido 2-aminoadípico, ácido 2-hidroxibutírico, ácido 2-isopropilmálico, ácido 3-metil-2- oxopentanóico, ácido 4-aminobenzóico, ácido 4-hidroxifenilacético, 4-hidroxifeniletanol (tirosol), ácido 5-oxotetrahidrofuran-2-carboxílico, ácido benzóico, ácido carbâmico, ácido citramálico, ácido dehidroabiético, dibutilftalato (DBP), DL-hidroxiglutaramato, dodecano, EDTA, ácido glutárico, ácido glicérico, ácido glioxílico, ácido itacônico, ácido lático, ácido levulínico, ácido malônico, ácido oxálico, ácido para-toluico, ácido quínico		

Classificação	Metabólitos intracelulares alterados pelo DMSO		
Classificação	Aumentados	Reduzidos	
Aminoácidos e suas isoformas	-	Tirosina, treonina, ornitina, lisina, metionina, histidina	
Derivados de aminoácidos	Ácido piroglutâmico, ácido N-acetilglutâmico, putrescina, S-adenosilmetionina	-	
Intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA)	Ácido fumárico, ácido málico, ácido α-cetobutírico, ácido α-cetoglutárico	-	
Ácidos graxos	Ácido 10,13-dimetiltetradecanóico (10,13-DMTDA), ácido dodecanóico, ácido mirístico, ácido esteárico	-	
Cofatores e vitaminas	Glutationa, ácido dehidroascórbico	Ácido γ-aminobutírico (GABA)	
Outros	Ácido itacônico, ácido 1- aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), ácido dehidroabiético, ácido benzóico, ácido malônico	Ácido carbâmico	
Total	19	8	

Tabela 2. Metabólitos intracelulares de biofilmes maduros de *C. albicans* SC5314, alterados pelo DMSO 0,02% (v/v).







FIGURA 3. Médias das abundâncias relativas (até 14) dos metabólitos intracelulares de *C. albicans* SC5314, que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0,05$) entre os grupos controle e DMSO.



FIGURA 4. Médias das abundâncias relativas (até 250) dos metabólitos intracelulares de *C. albicans* SC5314, que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0,05$) entre os grupos controle e DMSO. 10,13-DMTDA = Ácido 10,13-dimetiltetradecanóico.

Em comparação com o grupo controle, as amostras tratadas com DMSO 0,02% (v/v) apresentaram concentrações reduzidas dos aminoácidos tirosina, treonina, ornitina, lisina, metionina e histidina. Além disso, foram obtidos teores reduzidos do aminoácido γ -aminobutírico (GABA) e do ácido carbâmico, uma amina instável.

A presença do DMSO 0,02% (v/v) nas amostras provocou o aumento dos derivados de aminoácidos ácido piroglutâmico, ácido N-acetilglutâmico, putrescina e S-adenosilmetionina; dos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) ácido fumárico, ácido málico, ácido α-cetobutírico e ácido α-cetoglutárico; da vitamina ácido dehidroascórbico, que é a forma oxidada do ácido ascórbico; dos ácidos ácido 10,13-dimetiltetradecanóico (10,13-DMTDA), ácido graxos dodecanoico, ácido mirístico, ácido esteárico e do cofator glutationa. Além disso, aumentou a concentração do ácido itacônico, um intermediário do metabolismo dos ácidos dibásicos de cadeia ramificada C5; do ácido 1-aminociclopropano-1carboxílico (ACC), intermediário do metabolismo da metionina; do ácido dehidroabiético, um isoprenóide; do ácido benzóico, um ácido carboxílico aromático e do ácido malônico, um inibidor da respiração celular.

Para a visualização das vias metabólicas afetadas pelo tratamento com DMSO foi aplicada a análise PAPi. O resultado mostrou probabilidade de alteração de 13 vias daquelas envolvidas no metabolismo celular primário e secundário, das quais 7 foram *down-reguladas* e 6 foram *up-reguladas* pelo DMSO 0,02% (v/v) (Figura 5).



FIGURA 5. Vias metabólicas com atividade alterada ($p \le 0,05$) pela presença do DMSO 0,02% (v/v) em amostras de biofilmes de *C. albicans* SC5314. Vias com escore de atividade (EA) inferior a 0 representam aquelas *down-reguladas* pelo DMSO e vias com EA superior a 0 representam aquelas *up-reguladas*.

Foi possível constatar que a maioria das vias metabólicas alteradas significativamente foram *down-reguladas* pelo DMSO 0,02% (v/v), especialmente aquelas ligadas à biossíntese de ácidos graxos e ao metabolismo de carboidratos. As vias *up-reguladas* foram, na maior parte, aquelas envolvidas com o metabolismo de aminoácidos e de cofatores e vitaminas (Tabela 3).

Classificação	Vias metabólicas alteradas pelo DMSO		
Classificação	Up-reguladas	Down-reguladas	
Metabolismo de	Metabolismo da beta-alanina	-	
aminoacidos	Metabolismo da D-arginina e D-ornitina		
Metabolismo de lipídios	-	Biossíntese de ácidos graxos	
Metabolismo de	-	Via das pentoses fosfato	
carboidratos		Interconversões entre pentose e glicuronato	
		Metabolismo do ascorbato e aldarato	
Metabolismo do carbono	-	Metabolismo do piruvato	
Metabolismo energético	Metabolismo do enxofre	Metabolismo do metano	
Metabolismo de	Metabolismo da biotina	Metabolismo da vitamina B6	
cofatores e vitaminas	Biossíntese de ubiquinona e outras terpeno-quinonas		
Metabolismo de metabólitos secundários	Biossíntese de betalaína	-	
Total	6	7	

Tabela 3. Vias metabólicas com atividade alterada pela presença de DMSO 0,02% (v/v) em amostras de biofilmes de *C. albicans* SC5314.

A rede metabólica representando as principais vias metabólicas alteradas e seus respectivos metabólitos aumentados ou diminuídos pelo DMSO 0,02% (v/v), em biofilmes de *C. albicans* SC5314, está ilustrada na figura 6.



FIGURA 6. Rede metabólica das vias e dos metabólitos intracelulares de *C. albicans* SC5314 alterados pela presença de DMSO 0,02% (v/v). Vias *up-reguladas* e metabólitos aumentados estão representados em vermelho e vias down-reguladas e metabólitos reduzidos estão representados em azul. \bigotimes = inibição.

4. DISCUSSÃO

O DMSO, em concentrações inferiores a 1% (v/v), é capaz de promover redução no crescimento de 8 espécies de *Candida* sp. (RODRíGUEZ-TUDELA et al., 2001) e, em concentrações variando de 2,5 a 7,5% (v/v), reduz a formação de tubos germinativos de *C. albicans,* de maneira dose-dependente (RANDHAWA, 2008). Dessa forma, é possível que concentrações ainda mais altas levem a severa redução na viabilidade e morte celular, como já foi descrito para *Saccharomyces cerevisiae,* outro fungo da ordem Saccharomycetales (YEE et al., 1972). Esses estudos se ativeram apenas à morfologia fúngica, mas colocam em dúvida a viabilidade do uso do DMSO, considerando as alterações por ele causadas e a validade dos resultados em testes com antifúngicos (YU & QUINN, 1994; ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2012; HAZEN, 2013; NETIKOVA et al., 2013).

A toxicidade do DMSO frente a células procarióticas e eucarióticas se dá, principalmente, devido à sua afinidade pela porção polar da bicamada lipídica, resultando na desorganização dos lipídios e aumentando sua permeabilidade (TRISTAM-NAGLE et al., 1998; YU & QUINN, 2000; SUM & PABLO, 2003; MÉNORVAL et al., 2012; MALAJCZUK et al., 2013). Tal característica tornou seu uso de grande valor nas áreas da farmacologia e da genética, onde o aumento da permeabilidade facilita a absorção de antifúngicos e a incorporação de DNA (HILL et al., 1991; NOTMAN et al., 2007) e na criopreservação de células, já que o DMSO interrompe a rede de moléculas de água na proximidade da superfície da membrana lipídica, reduzindo o estresse causado pelas alterações no volume da água durante o processo de congelamento e descongelamento (CHENG et al., 2015). Apesar disso, sabe-se que a determinadas concentrações (>10% v/v), o DMSO danifica a integridade da membrana celular de leveduras (MURATA et al., 2003); porém, muito pouco foi estudado sobre tal processo e sua relação com alterações metabólicas causadas nesses organismos.

Por meio de experimentos de genômica funcional utilizando DMSO a uma concentração de 1%, Gaytán et al. (2013) demonstraram que, em *S. cerevisiae*, três processos celulares são requeridos na resistência ao solvente: (1) transporte entre complexo de Golgi e retículo endoplasmático; (2) ação do complexo SWR1, um complexo proteico envolvido na remodelagem de cromatina e na

resposta ao estresse, incluindo estresse osmolar e em parede celular; e (3) reparação do DNA. Os autores postularam que o mecanismo de toxicidade do DMSO em leveduras é diferende daquele apresentado em células de nematóides e células humanas. Em uma análise de microarranjo de DNA de S. cerevisiae, Zhang et al. (2003) observaram que a expressão de 1.338 genes foi afetada na presença de DMSO 1% (v/v). Tais genes eram relativos a uma variedade de funções celulares como o metabolismo de aminoácidos, carboidratos e lipídios, resposta ao estresse e metabolismo energético, sendo que a maioria dos genes envolvidos nas vias de biossíntese lipídica foram down-regulados e aqueles relativos à biossíntese de aminoácidos foram up-regulados. Alguns dos genes reportados pertencem ao cluster de genes de resposta ao estresse ambiental previamente estudado por Gash et al. (2000). Mais tarde, Zhang et al. (2013) apresentaram que 73 genes em S. cerevisiae sofreram alterações na presença do DMSO, incluindo o metabolismo de carboidratos, o metabolismo de aminoácidos e o metabolismo de lipídeos além do metabolismo do fosfato e de nucleotídeos, semelhantemente aos achados no presente estudo.

O metabolismo do DMSO em *C. albicans* ainda não é totalmente compreendido. Em *S. cerevisiae* parece haver mais de um sistema enzimático capaz de reduzir o DMSO a dimetil sulfeto (DMS), sendo que a metionina sulfóxido redutase, codificada pelo gene *MXR1*, mostrou ser a principal enzima envolvida, sendo, ainda, responsável pela proteção contra o estresse oxidativo (HANSEN, 1999; LE et al., 2009). Porém, Kwark et al. (2010) demonstraram que o DMSO pode atuar inibindo seletivamente a função antioxidante de um dos três tipos de metionina sulfóxido redutase, a MsrA, resultando em um aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo em *S. cerevisiae*.

Em certas leveduras é possível que o DMSO seja metabolizado a DMS pela aril-álcool desidrogenase, o qual seria posteriormente convertido a S-adenosilmetionina na via da metionina, usada nas reações de metilação para síntese de fosfolipídeos (MURATA et al., 2003). Além de apresentar o próprio *MXR1*, *C. albicans* SC5314 possui os genes *IFD6* e *LPG20* que codificam enzimas similares à aril-álcool desidrogenase (CGD, 2017). No presente estudo, foi constatado o aumento intracelular de S-adenosilmetionina, mas não foi observada atividade aumentada na via de biossíntese de fosfolipídeos. Entretanto, tal aumento de S-adenosilmetionina é compatível com a metabolização do DMSO, não detectado nas amostras.

De uma maneira global, as concentrações mais altas dos metabólitos intracelulares indica que o fluxo metabólico para suas respectivas vias às quais estes participam apresenta-se reduzido dessa maneira, para a maioria dos casos onde houve redução da concentração dos metabólitos, é assumido que suas vias apresentem *up-regulação* (AGGIO et al., 2010).

Metabolismo de lipídeos

Das vias metabólicas *down-reguladas* pelo DMSO, a biossíntese de ácidos graxos foi o processo mais fortemente afetado, seguido do metabolismo de carboidratos.

Estudos já haviam mostrado que os lipídeos, além de representarem componentes estruturais (constituição das membranas) e metabólicos (armazenamento de energia) essenciais, têm papel importante na formação do biofilme e resistência à drogas em *C. albicans* (MUKHERJEE et al., 2003; LATIFF et al., 2011). Ácidos graxos podem ser incorporados em fosfolipídeos e esfingolipídeos ou servir como reserva energética na forma de triacilgliceróis e ésteres de esteróis, além de funcionar como reguladores transcricionais, atuar como moléculas sinalizadoras e de modificar proteínas em fase pós-traducional (KLUG & DAUM, 2014).

Posto isso, postulamos que a redução na biossíntese de ácidos graxos pode estar relacionada ao aumento na concentração intracelular de ácido 10,13dimetiltetradecanóico (10,13-DMTDA), ácido dodecanóico, ácido mirístico, e ácido esteárico, provavelmente ocasionado devido à sua baixa utilização, pois o excesso de lipídeos pode causar lipotoxicidade às células (GABARINO et al., 2009; EISENBERG & BÜTTNER, 2014). Ainda, essa *down-regulação* pode ter ocorrido devido ao fato de o DMSO ter reduzido a atividade da via das pentoses fosfato, que representa uma alternativa ao metabolismo da glicose e produz pentoses e NADPH, e no metabolismo do piruvato, os quais tem importante papel na biossíntese de ácidos graxos.

Controversamente, Murata et al. (2003) demonstraram que o DMSO, pela up-regulação da expressão gênica em S. cerevisiae, eleva a biossíntese de fosfolipídeos, induzindo a proliferação da membrana celular, em resposta aos danos que essa substância pode causar à sua integridade. O estudo também identificou aumento na expressão de genes envolvidos na síntese de metionina, o oposto observado no presente trabalho, e o aumento na expressão de genes envolvidos na síntese de componentes e organização da parede celular. Em *C. albicans*, foi observado por León-García et al. (2017) o aumento da expressão de proteínas de parede celular em resposta dose-dependente à exposição ao DMSO, tais proteínas também seriam conhecidas pela sua resposta ao estresse. Porém, nossos resultados foram obtidos com uma concentração de DMSO cerca de 45 vezes mais baixa daquelas utilizadas nos trabalhos revisados, podendo ser esse o motivo pelo qual não foi observado mecanismo de correção dos danos causados pelo solvente.

Os resultados desse estudo parecem corroborar com os achados de diversos autores que reportaram as alterações na composição lipídica das membranas celulares de leveduras causadas por solventes orgânicos como o DMSO (SIKKEMA et al., 1994; MIURA et al., 2000; ZHANG et al., 2003). Acreditamos que o DMSO, em concentrações acima daquelas testadas no presente estudo, possa levar à uma sensibilização e reorganização das membranas.

Metabolismo do carbono e de carboidratos

Diferentemente de S. cerevisiae, a C. albicans é caracterizada como crabtreenegativa, ou seja, apenas inicia a fermentação em condições anaeróbicas, preferindo a oxidação de carboidratos pela via respiratória (DASHKO et al., 2014). Apesar da regulação da assimilação e do metabolismo do carbono se apresentarem fundamentalmente diferentes entre estas espécies, as vias do metabolismo central do carbono são basicamente idênticas entre diferentes espécies de leveduras (SANDAI et al., 2012; ASKEW et al., 2009), e se observa que as respostas metabólicas frente ao DMSO parecem ser semelhantes.

Zhang et al. (2003) demonstraram que a presença de DMSO em culturas de *S. cerevisiae* também afeta, além do metabolismo de lipídeos, a expressão de diversos genes das vias do metabolismo central de carboidratos, incluindo a glicólise e gluconeogênese, ciclo dos TCA, via do metabolismo de açúcares e via das pentoses fosfato. Os autores observaram que isoenzimas envolvidas na glicólise foram reduzidas e as isoenzimas da piruvato carboxilase, da citrato sintetase e da isocitrato desidrogenase, envolvidas no ciclo dos TCA, foram aumentadas na presença do solvente. Aparentemente, processos similares ocorreram no presente trabalho, já que foi observada *down-regulação* nas vias do metabolismo do piruvato, das pentoses fosfato, de interconversões entre pentose e glicuronato e do metabolismo do ascorbato e aldarato e, ainda, aumento de intermediários do ciclo dos TCA (ácido α-cetoglutárico, ácido fumárico e ácido málico).

Em leveduras, após sua formação pela glicólise, o piruvato pode ter dois diferentes destinos: (1) pode ser diretamente convertido a acetil-coenzima A (CoA) pelo complexo enzimático da piruvato desidrogenase (PDH) após seu tranporte para o interior da mitocôndria, (2) ou pode ser convertido a acetil-CoA no citosol pela via complexo PDH-*bypass*, geralmente em condições de hipóxia. Em *C. albicans*, a expressão de genes envolvidos na glicólise e fermentação é aumentada na hipóxia (SETIADI et al., 2006; ASKEW et al., 2009; SYNNOTT et al., 2010). Marttila et al. (2013) demonstraram alta produção de acetaldeído pela *C. albicans* em condições de hipóxia e anóxia e na presença de glicose, devido à fermentação do piruvato pela via PDH-bypass, corroborando com o trabalho de Rozpedowska et al. (2011) onde foi demonstrado que *C. albicans* é uma fraca produtora de etanol.

No presente estudo, a formação de biofilmes maduros em papel pode ter levado à uma redução do fluxo de oxigênio nas camadas mais interiorizadas do biofilme; ou ainda, é possível que o sistema implementado para crescimento dos biofilmes tenha o aporte de oxigênio reduzido (trocas gasosas não foram mensuradas) e com isso, o complexo PDH-*bypass* tenha sido ativado e forneça acetil-CoA para síntese de ácidos graxos, em ambos os grupos, controle e tratado. Porém, a literatura mostra que o complexo PDH mitocondrial tem maior afinidade pelo piruvato, que o complexo PDH-*bypass*, quando os níveis de glicose estão mais baixos (PRONK et al., 1996). Assim, no grupo tratado com DMSO, com a baixa atividade nas vias de metabolismo de carboidratos (via das pentoses-fosfato e interconversões entre pentose e glicuronato) e consequente redução no metabolismo do piruvato, acreditamos que esse tenha sido direcionado prioritariamente ao complexo PDH mitocondrial, explicando a redução na biossíntese de ácidos graxos. Ainda nesse contexto, postulamos que o aumento intracelular dos produtos da fermentação (acetato e etanol) possa ter ativado o ciclo do glioxilato,

fazendo com que a célula utilize tais compostos como fonte de carbono (LORENZ & FINK, 2002) e explicando o aumento do ácido málico visualizado nessa análise.

Metabolismo de aminoácidos

Nos experimentos de Zhang et al. (2003) com *S. cerevisiae*, o DMSO *up-regulou* a expressão da maioria das isoenzimas de biossíntese de aminoácidos, daquelas alteradas, incluindo a aspartato-semialdeído desidrogenase (hom2), envolvida na biossíntese de aminoácidos como lisina, metionina e treonina; fenótipo oposto ao observado no presente estudo. Os autores reportaram, ainda, aumento na expressão de cinco enzimas responsáveis pela biossíntese de histidina, que neste estudo se apresentou reduzida pelo DMSO, provavelmente em função do aumento de seu metabolismo, e relataram aumento de enzimas do ciclo da uréia, e consequentemente da via de biossíntese da arginina, semelhantemente ao constatado neste estudo.

A *up-regulação* do metabolismo da arginina já foi previamente observada no mecanismo de morfogênese de *C. albicans*, na transição de levedura para forma filamentosa, o que poderia ter ocorrido no presente estudo, já que o estímulo à filamentação geralmente ocorre em resposta a alterações ambientais como meio de adaptação e sobrevivência frente a uma substância xenobiótica (BROWN & GOW, 1999; LORENZ & FINK, 2001; GHOSH et al., 2009; HAN et al., 2012), apesar de tal parâmetro não ter sido avaliado na presente análise. Jiménez-López et al. (2013) reportaram que genes envolvidos na via de biossíntese de arginina são induzidos em *C. albicans* também durante o estresse oxidativo provocado por sua fagocitose.

Poliaminas são moléculas conhecidas por regular a formação de hifas em *C. albicans* (HERRERO et al., 1999; UENO et al., 2004) além de serem requeridas no processo de meiose e esporulação em leveduras (BRAWLEY & FERRO, 1979). Portanto, o aumento de ornitina e, consequentemente de poliaminas, está relacionado à transição de levedura para hifa e consequente proteção do fungo, como observado por Cao et al. (2013) quando o microorganismo foi desafiado com a anfotericina B. Perfil semelhante foi observado no presente estudo, com o aumento da poliamina putrescina e redução nos níveis de seu precursor ornitina.

Porém, em se tratando de transições morfológicas e filamentação, Kamthan et al. (2012) observaram aumento significativo de aminoácidos como lisina e tirosina

quando a morfogênese foi induzida por n-acetilglucosamina em *C. albicans*, opostamente ao ocorrido com o DMSO neste estudo, o qual induziu a redução desses mesmos aminoácidos. No entando a tirosina, precursor do tirosol, uma molécula de *quorum-sensing* que é secretada e estimula a filamentação e a produção de biofilme em *C. albicans*, pode ter apresentado redução devido à produção e excreção de tirosol (níveis intracelulares não alterados), sinalizando aumento da filamentação frente ao DMSO (CHEN et al., 2004; ALEM et al., 2006).

Algumas outras divergências ainda foram observadas se comparando os achados no presente estudo com a literatura, como aumento da tirosina e *up-regulação* do metabolismo de ácidos graxos durante a transição morfológica (HAN et al., 2012). Porém, a maioria dos artigos revisados testaram as transições entre leveduras e hifas, e não a filamentação em biofilmes maduros, como aplicado no presente trabalho. A literatura revela que os perfis proteicos citoplasmáticos são bastante diferentes entre células leveduriformes, hifas e biofilmes (MARTÍNEZ-GOMARIZ et al., 2009).

O GABA, um aminoácido não proteinogênico que pode ter sido originado a partir da descarboxilação do ácido glutâmico, ou formado a partir da degradação de poliaminas (KUMAR & PUNEKAR, 1997), teve sua abundância reduzida pelo DMSO, indicando o aumento da poliamina putrescina no presente estudo. Apesar de seu uso como fonte de nitrogênio já ter sido reportado em *S. cerevisiae* (RAMOS et al., 1985), Coleman et al. (2001) propuseram que o GABA intracelular é um importante fator de proteção de *S. cerevisiae* contra o estresse oxidativo. A via de degradação do GABA em ácido succínico ocorre em *S. cerevisiae* e parece estar presente em *C. albicans*, devido à presença de genes ortólogos às enzimas de *S. cerevisiae* (MCNEMAR et al., 2001).

A *up-regulação* do metabolismo da beta-alanina, importante para a formação da coenzima A, pode ter tido origem no aumento dos níveis de S-adenosilmetionina e de putrescina (e consequente redução da metionina) que, juntamente, formam a spermidina, precursor da beta-alanina. Ainda, tal *up-regulação* pode ter ocorrido devido ao aumento do ácido malônico, que pode formar malonato semialdeído e, posteriormente, originar a beta-alanina. Porém, o ácido malônico é conhecido por ser um inibidor competitivo da enzima succinato desidrogenase, presente no ciclo dos TCA e na cadeia transportadora de elétrons, reduzindo a respiração celular

(DERVARTANIAN & VEEGER, 1964) sendo, possivelmente, o aumento da concentração de ácido málico no ciclo dos TCA na presença de DMSO 0,02% (v/v), decorrente da ativação do ciclo do glioxilato. O ciclo do glioxilato permite à celula incorporar compostos de dois carbonos, como etanol e acetato, ao ciclo dos TCA e geralmente é requerido em Candida spp. em casos onde a virulência está aumentada (CGD, 2017). Como resposta à inibição da cadeia respiratória, C. albicans é capaz de ativar diferentes vias respiratórias alternativas com oxidases alternativas que podem, inclusive, ser expressas na presença de oxidantes, representando também vias de proteção contra o estresse oxidativo, com a redução da ubiquinona (AOKI & ITO-KUWA, 1984; HUH & KANG, 2001; HELMERHORST et al., 2002), embora alguns autores já tenham reportado a que a inibição parcial da cadeia trasportadora de elétrons possa levar ao estresse oxidativo (RUY & VERCESI, 2006; CHABRIER-ROSELLÓ et al., 2010; WANG et al., 2015). O aumento de ácido malônico pode, ainda, estar relacionado à via da beta-oxidação modificada, que ocorre em C. albicans e envolve o metabolismo do propionil-CoA, substância que causa toxicidade, e pode ser proveniente do próprio metabolismo da beta-alanina (OTZEN et al., 2014).

Acreditamos que a *up-regulação* observada nas vias do metabolismo de aminoácidos, com a consequente redução nas suas concentrações e aumento de seus derivados, seja decorrente da redução na respiração celular, que já é comum em biofilmes maduros, onde as camadas mais profundas permanecem em hipóxia, ocorrendo a fermentação, perfil agravado pelo DMSO 0,02% (v/v). Nós postulamos que o ácido malônico, aumentado pelo DMSO, esteja causando o bloqueio do ciclo dos TCA e da cadeia respiratória, levando a célula a elevar o processo fermentativo e a degradação de aminoácidos para produzir energia e ao aumento de EROs. Adicionalmente, supomos que o aumento da concentração do ácido fumárico tenha ocorrido em consequência do aumento na atividade do ciclo da uréia; e o aumento da concentração de ácido cetoglutárico tenha decorrido da degradação do ácido glutâmico, e não de uma *up-regulação* no ciclo dos TCA.

Metabolismo de cofatores e vitaminas

Frente a situações de estresse oxidativo, é sabido que as células eucarióticas rapidamente produzem RNAms que codificam proteínas de detoxificação e reparo,

representadas em *C. albicans* pela catalase, pela glutationa peroxidase e pela superoxido-dismutase; além de ativar genes que codificam componentes dos sistemas tiorredoxina e glutationa/glutarredoxina. Nessa espécie, três vias sinalizadoras são bem caracterizadas pela sua ativação em resposta às espécies reativas do oxigênio (EROs): fator de transcrição Cap1, Hog1 proteína quinase ativada por estresse e Rad53 quinase de controle de danos ao DNA (DANTAS et al., 2015).

Guedouari et al. (2014) demonstraram que a glutationa, um importatnte antioxidante intracelular, é consumida no processo de filamentação. Portanto, o aumento da glutationa e de um de seus precursores, o ácido piroglutâmico, no grupo tratado com DMSO 0,02% (v/v), sugere que este não estaria estimulando a transição morfológica e sim, induzindo o estresse oxidativo. Durante o estresse oxidativo em *C. albicans*, é possível observar uma inibição rápida e reversível da síntese de proteínas (SUNDARAM & GRANT, 2014), similarmente ao que foi detectado nos biofilmes cultivados com DMSO 0,02% (v/v). Porém, Abegg et al. (2012) concluíram que o montante de glutationa intracelular, isoladamente, não deve servir de parâmetro para a avaliação da resposta de espécies de *Candida* ao estresse oxidativo.

A ubiquinona9 (CoQ9) é uma quinona isoprenoide encontrada em membranas de organelas de *C. albicans* que participa, dentre outros processos celulares, da cadeia transportadora de elétrons e que também possui papel importante na proteção contra o estresse oxidativo (SZKOPINSKA, 2000; DIEZMANN et al., 2004; TURUNEN et al., 2004; LI et al., 2015). A via de biossíntese da ubiquinona pareceu estar *up-regulada* na presença do DMSO 0,02% (v/v), provavelmente em resposta ao estresse oxidativo por este causado ou ainda, como citado anteriormente, devido à ativação de vias respiratórias alternativas.

Estudos anteriores já reportaram que o uso do DMSO como crioprotetor é equivocadamente atribuído à sua capacidade antioxidante (HOMER et al., 2005; KASHINO et al., 2007), colocando à prova seu uso para tal finalidade. Adicionalmente, Sadowska-Bartosz et al. (2013), demonstraram que essa substância foi capaz de provocar estresse oxidativo em culturas de *S. cerevisiae* e de aumentar a concentração da glutationa de maneira dose-dependente, de modo similar ao observano no presente estudo.

33

A *C. albicans* é auxotrófica em relação à biotina, cofator do metabolismo de ácidos graxos e de carboidratos, sendo a sua suplementação no meio de cultura, ou de substâncias correlatas, essencial ao crescimento robusto dessa levedura (FIRESTONE & KOSER, 1960). Segundo Hussin et al. (2016), além de possuir papel importante como cofator enzimático, a biotina também é um regulador morfológico, estimulando a formação de tubo germinativo em *C. albicans*.

Similarmente aos achados nesse estudo, Zhang et al. (2003) reportaram que o DMSO *up-regulou* o metabolismo da biotina em *S. cerevisiae* porém, os autores relataram também a *up-regulação* dos genes envolvidos na biossíntese de piridoxal fosfato, no metabolismo da vitamina B6, o qual pareceu ser *down-regulado* pelo DMSO 0,02% (v/v) em *C. albicans* SC5314. A via de recuperação da vitamina B6, suplementada no meio de cultura sob a forma de cloridrato de piridoxala, é responsável por liberar peróxido de hidrogênio para a síntese de piridoxal-5'-fosfato (vitamina B6) a partir da piridoxina-5'-fosfato. Logo, postulamos que a sua *down-regulação* tenha ocorrido em resposta ao estresse oxidativo que o DMSO pareceu causar à célula, já que as EROs geradas por essa via contribuiriam ao estado degradativo celular.

Na presença do DMSO 0,02% (v/v) foi detectado aumento do metabólito ácido dehidroascórbico, um precursor do ascorbato, devido à *down-regulação* da via de metabolismo do ascorbato e aldarato, possivelmente ocasionada em resposta à redução da atividade das vias de metabolismo de carboidratos. A oxidação do ascorbato interiorizado na célula leva à produção do ácido dehidroascórbico; porém, neste estudo não foi adicionado ascorbato ou derivados ao meio de cultura. Surpreendentemente, a literatura indica que *C. albicans* não sintetiza ascorbato, sendo o eritroascorbato (dehidro-D-arabinono-1,4-lactona) a molécula análoga produzida pela espécie (LEUNG & LOEWUS, 1985; NICK et al., 1986, HUH et al., 1994; KIM et al., 1996). Assim, futuras análises são importantes para verificar a presença e metabolismo dessa vitamina na espécie.

Metabolismo energético

No organismo modelo *S. cerevisiae*, o metabolismo do enxofre, que corresponde da assimilação de sulfato inorgânico à síntese de aminoacidos sulfurados, já é bastante compreendido. Em estudo realizado com *Yarrowia lipolytica*

foi observado que a alta suplementação de uma fonte de enxofre leva ao estresse celular, devido à produção de sulfitos, com consequente decréscimo dos intermediários da via da glutationa (HEBERT et al., 2013), aparentemente de forma diferente ao que ocorreu com *C. albicans* SC5314 exposta ao DMSO 0,02% (v/v). Contudo, uma análise evolutiva das vias desse metabolismo em espécies de Saccharomycetes (*S. cerevisiae*, *C. glabrata* e *Y. lipolytica*) propôs que existem diferenças nos grupos de enzimas que metabolizam aminoácidos sulfurados (HÉBERT et al., 2011).

Segundo nossas observações, o metabolismo do enxofre parece estar *up-regulado* pelo DMSO 0,02% (v/v), possivelmente devido à própria conversão de DMSO em DMS e, posteriormente a S-adenosilmetionina, a qual teve sua concentração aumentada nas amostras tratadas.

Até o momento, a espécie *Candida boidinii* foi a única desse gênero identificada como metilotrófica, ou seja, com a capacidade de usar o metanol como única fonte de carbono, sendo um dos organismos com papel indispensável no ciclo global do carbono, mais especificamente no que corresponde ao ciclo do metano, participando de biotransformações entre o metano e o gás carbônico (CO₂) (YURIMOTO et al., 2011).

Nós observamos *down-regulação* do metabolismo do metano em biofilmes de *C. albicans* na presença de DMSO e, embora tal via não seja estudada nessa espécie, é possível que partes das reações metabólicas ocorram devido à presença de enzimas comuns aos processos metabólicos. Nesse caso, acreditamos que o aumento da GSH induzido pelo DMSO 0,02% (v/v) possa ter acusado a *down-regulação* do metabolismo do metano, no qual participa da oxidação do formaldeído a CO_2 (NEGRUTA et al., 2010). A espécie *C. albicans* não possui a capacidade de metabolizar o metanol a formaldeído, sendo esse último proveniente apenas do meio externo, o que não ocorreu no presente trabalho. Porém, Klein et al. (1981) detectaram em sistemas biológicos a formação de folmaldeído a partir da reação entre o DMSO e um radical hidroxila, sendo uma possível explicação para a detecção dessa via no presente estudo, onde o folmaldeído não foi identificado, por ter sido, provavelmente, catabolizado a CO_2 ou evaporado no processo de liofilização.

Metabolismo de metabólitos secundários

Tirosol e farnesol são dois dos metabólitos secundários produzidos por *C. albicans*, bastante conhecidos por sua função no sistema complexo de *quorumsensing* como moléculas antagônicas sinalizadoras da filamentação. Outra molécula sinalizadora, o ácido indol-3-acético, já foi identificado na espécie e a ele foram atribuídas as funções de indução da filamentação e da adesão ao substrato, quando produzido em diferentes concentrações (DUFOUR & RAO; 2011). Nesse estudo apenas o tirosol foi identificado; porém, sem apresentar abundâncias significativamente diferentes entre os grupos experimentais.

As betalaínas são pigmentos encontrados em espécies de plantas pertencentes à ordem Caryophyllares e em aguns fungos superiores como em *Amanita muscaria* (STRACK et al., 2003), e nunca foi descrita para espécie *C. albicans*. A suposta *up-regulação* de sua via biossintética nesse estudo se dá, novamente, devido a processos comuns partilhados entre as epécies que não necessariamente serão capazes de gerar um mesmo produto final.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de os dois principais elementos desse trabalho, a *C. albicans* SC5314 e o DMSO, possuírem grande importância à ciência e à saúde, observamos que a literatura envolvendo ambos os temas é bastante escassa. A maior parte das publicações referentes ao tema diz respeito à levedura *S. cerevisiae*, e geralmente tratam de análises genéticas, e não metabólicas. Contudo, sabe-se que nem sempre o fenótipo corresponde ao genótipo de um organismo, sendo as análises pós-genômicas de grande importância ao entendimento da fisiologia celular (VILLAS-BÔAS & GOMBERT, 2006). Este trabalho é o primeiro relato da interferência do DMSO no perfil metabólico dos biofilmes de *C. albicans*.

A análise do metaboloma e das possíveis vias envolvidas no metabolismo intracelular de biofilmes de C. albicans SC5314, crescidos na ausência e presença de DMSO 0,02% (v/v), permitiu constatar alterações especialmente direcionadas ao metabolismo de lipídeos, ao metabolismo central do carbono e de carboidratos, ao metabolismo de aminoácidos e de cofatores e vitaminas, causados por essa substância. O principal alvo foi a biossíntese de ácidos graxos, onde observou-se sua down-regulação, com consequente alteração de outras vias do metabolismo dessa levedura. corroborando com estudos realizados com S. cerevisiae. Adicionalmente, postula-se que o DMSO causou estresse oxidativo nas células tratadas, também em concordância com estudos previamente publicados.

Pela primeira vez foi identificada a presença do metabólito ácido dehidroascórbico, um precursor e produto do ascorbato, nessa espécie, fato que merece uma investigação futura mais minuciosa.

Tendo em vista as alterações metabólicas observadas nesse estudo, causadas pelo DMSO 0,02% (v/v), somadas aos relatos em literatura de sua ação sobre a fisiologia das células de leveduras, consideramos que deve haver cautela no uso dessa substância como solvente de antifúngicos. O DMSO não só facilita a penetração de fármacos, como consta em literatura, como também interfere no metabolismo celular, podendo causar efeitos sinérgicos que não seriam traduzidos para a prática clínica.

37

6. REFERÊNCIAS

ABEGG, M. A. et al. Glutathione levels in and total antioxidant capacity of *Candida* sp. cells exposed to oxidative stress caused by hydrogen peroxide. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 620-6, 2012.

AGGIO, R. B. M.; RUGGIERO, K.; VILLAS-BOAS, S. G. Pathway activity profiling (PAPi): from the metabolite profile to the metabolic pathway activity. **Bioinformatics**, v. 26, n. 23, p. 2969-76, 2010.

ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. et al. Comparison of dimethyl sulfoxide and water as solvents for echinocandin susceptibility testing by the EUCAST methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 7, p. 2509–12, 2012.

ALEM, M. A. S. et al. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. **Eukariotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1770–9, 2006.

AOKI, S.; ITO-KUWA, S. The appearance and characterization of cyanide-resistant respiration in the fungus *Candida albicans*. **Microbiology and Immunology**, v. 28, n. 4, p. 393-406, 1984.

ASKEW, C. et al. Transcriptional regulation of carbohydrate metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000612, 2009.

BRAWLEY, J. V.; FERRO, A. J. Polyamine biosynthesis during germination of yeast ascospores. **Journal of Bacteriology**, v. 140, n. 2, p. 649-54, 1979.

BRAYTON, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **The Cornell Veterinarian**, v. 76, p. 61-90, 1986.

38

BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 333–8, 1999.

CAO, Y. Y. et al. Effect of amphotericin B on the metabolic profiles of *Candida albicans*. Journal of Proteome Research, v. 12, n. 6, p. 2921–32, 2013.

CDC - Centers for Disease Controls and Prevention (2013). **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013: fluconazole-resistant** *Candida*. Disponível em https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf. Acesso em: 22/06/2017.

CGD – *Candida* Genome Database, 2017. Disponível em Acesso em: 28/06/2017.">http://www.candidagenome.org/.> Acesso em: 28/06/2017.

CHABRIER-ROSELLÓ, Y. et al. Inhibition of electron transport chain assembly and function promotes photodynamic killing of *Candida*. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 99, n. 3, p. 117-25, 2010.

CHEN, H. et al. Tyrosol is a quorum sensing molecule in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 14, p. 5048–52, 2004.

CHENG, C. Y. et al. DMSO induces dehydration near lipid membrane surfaces. **Biophysical Journal**, v. 109, n. 2, p. 330–9, 2015.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth** dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard — third edition, M27-A3. Wayne, PA, 2008.

COLEMAN, S. T. et al. Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 1, p. 244–50, 2001.

DANTAS, A. S. et al. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. **Biomolecules**, v. 5, n. 1, p. 142-65, 2015.

DASHKO, S. et al. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 6, p. 826–32, 2014.

DE MÉNORVAL, M. A. et al. Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments *in silico* and with cells. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41733, 2012.

DERVARTANIAN, D. V.; VEEGER, C. Studies on succinate dehydrogenase: I. Spectral properties of the purified enzyme and formation of enzyme-competitive inhibitor complexes. **Biochimica et Biophysisca Acta – Specialized Section on Enzymological Subjects**, v. 92, n. 2, p. 233-47, 1964.

DIEZMANN, S. et al. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5624–35, 2004.

DUFOUR, N.; RAO, R. P. Secondary metabolites and other small molecules as intercellular pathogenic signals. **FEMS Microbiology Letters**, v. 314, n. 1, p. 10-7, 2011.

EISENBERG, T.; BÜTTNER, S. Lipids and cell death in yeast. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 1, p. 179-97, 2014.

EUCAST - European Committee on Antibiotic Susceptibility. **Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts, discussion document**. Clinical microbiology and infection, v. 9, n. 8, 2003.

FIRESTONE, B. Y.; KOSER, S. A. Growth promoting effect of some biotin analogues for *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 79, n. 5, p. 674-6, 1960.

GABARINO, J. et al. Sterol and diacylglycerol acyltransferase deficiency triggers fatty acid-mediated cell death. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 45, p. 30994–31005, 2009.

GASCH, A. P. et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, n. 12, p. 4241–57, 2000.

GAYTÁN, B. D. et al. Functional genomics indicates yeast requires Golgi/ER transport, chromatin remodeling, and DNA repair for low dose DMSO tolerance. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. 154, p. 1-9, 2013.

GHOSH, S. et al. Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 4, p. 1596–1605, 2009.

GILLUM, A. M.; TSAY, E. Y.; KIRSH, D. R. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* ura3 and *E. coli* pyrF mutations. **Molecular & General Genetics**, v. 198, n. 2, p. 179-82, 1984.

GUEDOUARI, H. et al. Changes in glutathione-dependent redox status and mitochondrial energetic strategies are part of the adaptive response during the filamentation process in *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, n. 9, p. 1855–69, 2014.

HAN, T.; CANNON, R. D.; VILLAS-BÔAS, S. G. Metabolome analysis during the morphological transition of *Candida albicans*. **Metabolomics**, v. 8, p. 1204-17, 2012.

HANSEN, J. Inactivation of *MXR1* abolishes formation of dimethyl sulfide from dimethyl ulfoxide in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3915-9, 1999.

41

HAZEN, K. C. Influence of DMSO on antifungal activity during susceptibility testing *in vitro*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, n. 1, p. 60–3, 2013.

HEBERT, A. et al. New insights into sulfur metabolism in yeasts as revealed by studies of *Yarrowia lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 1200-11, 2013.

HEBERT, A.; CASAREGOLA, S.; BECKERICH, J. M. et al. Biodiversity in sulfur metabolism in hemiascomycetous yeasts. **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 4, p. 366-78, 2011.

HELMERHORST, E. J. et al. Characterization of the mitochondrial respiratory pathways in *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1556, p. 73-80, 2002.

HERRERO, A. B. et al. Control of filament formation in *Candida albicans* by polyamine levels. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4870–8, 1999.

HILL, J. et al. DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. Nucleic Acids Research, v. 19, n. 20, p. 5791, 1991.

HOMER, N. Z. et al. Dimethylsulfoxide oxidizes glutathione *in vitro* and in human erythrocytes: kinetic analysis by ¹H NMR. **Cryobiology**, v. 50, n. 3, p. 317-24, 2005.

HUH, W. K. et al. Characterisation of D-arabinono-1,4-lactone oxidase from *Candida albicans* ATCC 10231. **European Journal of Biochemistry**, v. 225, n. 3, p. 1073-9, 1994.

HUH, W-K; KANG, S-O. Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. **The Biochemical Journal**, v. 356, n. 2, p. 595-604, 2001.

HUSSIN, N. A. et al. Biotin auxotrophy and biotin enhanced germ tube formation in *Candida albicans*. **Microorganisms**, v. 4, n. 37, p. 1-15, 2016.

JIMÉNEZ-LÓPEZ, C. et al. *Candida albicans* induces arginine biosynthetic genes in response to host-derived reactive oxygen species. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 1, p. 91–100, 2013.

KABIR, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AHMAD, Z. *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. International Scholarly Research Network - ISRN Microbiology, v. 2012, p. 1-15, 2012.

KAMTHAN, M. et al. Quantitative proteomics and metabolomics approaches to demonstrate N-acetyl-D-glucosamine inducible amino acid deprivation response as morphological switch in *Candida albicans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 5, p. 369–78, 2012.

KASHINO, G. et al. Effective suppression of bystander effects by DMSO treatment of irradiated CHO cells. **Journal of Radiation Research**, v. 48, n. 4, p. 327-33, 2007.

KIM, S. T. et al. D-arabinose dehydrogenase and biosynthesis of erythroascorbic acid in *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1297, n. 1, p. 1-8, 1996.

KLEIN, S. M.; COHEN, G.; CEDERBAUM, A. I. Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical generating systems. **Biochemistry**, v. 20, p. 6006-12, 1981.

KLUG, L.; DAUM, G. Yeast lipid metabolism at a glance. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 3, p. 369–88, 2014.

KUMAR, S.; PUNEKAR, N. S. The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in fungi. **Mycology Research**, v. 101, n. 4, p. 403-9, 1997.

KWAK, G. H.; CHOI, S. H.; KIM, H. Y. Dimethyl sulfoxide elevates hydrogen peroxide-mediated cell death in *Saccharomyces cerevisiae* by inhibiting the antioxidant function of methionine sulfoxide reductase A. **BMB Reports**, v. 43, n. 9, p. 622-8, 2010.

LATIFF, A. A. et al. Lipidomics of *Candida albicans* biofilms reveals phasedependent production of phospholipid molecular classes and role for lipid rafts in biofilm formation. **Microbiology**, v. 157, n. 11, p. 3232–42, 2011.

LE, D. T. et al. Functional analysis of free methionine-*R*-sulfoxide reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 7, p. 4354-64, 2009.

LEÓN-GARCIA, M. C. et al. Evaluation of cell wall damage by dimethyl sulfoxide in *Candida* species. **Research in Microbiology** (2017) Disponível em http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250817301122?via%3Dihub Acesso em 30/08/2017.

LEUNG, C. T.; LOEWUS, F. A. Concerning the presence and formation of ascorbic acid in yeasts. **Plant Science**, v. 38, n. 1, p. 65-9, 1985.

LI, L. et al. Flavodoxin-like proteins protect *Candida albicans* from oxidative stress and promote virulence. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 9, p. e1005147, 2015.

LORENZ, M. C.; FINK, G. R. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 5, p. 657-62, 2002.

LORENZ, M. C.; FINK, G. R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. **Nature**, v. 412, n. 6842, p. 83–6, 2001.

LOW, A. et al. Incidence of opportunistic infections and the impact of antiretroviral therapy among HIV-infected adults in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 12, p. 1595-1693, 2016.

MALAJCZUK, C. J.; HUGHES, Z. E.; MANCERA, R. L. Molecular dynamics simulations of the interactions of DMSO, mono- and polyhydroxylated cryosolvents with a hydrated phospholipid bilayer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1828, n. 9, p. 2041–55, 2013.

MARTÍNEZ-GOMARIZ, M. et al. Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*. **Proteomics**, v. 9, n. 8, p. 2230–52, 2009.

MARTTILA, E. et al. Fermentative 2-carbon metabolism produces carcinogenic levels of acetaldehyde in *Candida albicans*. **Molecular Oral Microbiology**, v. 28, p. 281-91, 2013.

McNEMAR, M. D.; GORMAN, J. A.; BUCKLEY, H. R. Isolation of a gene encoding a putative polyamine transporter from *Candida albicans*, *GPT1*. **Yeast**, v. 18, p. 555-61, 2001.

MIURA, S.;et al. Screening of genes involved in isooctane tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by using mRNA differential display. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4883-9, 2000.

MUKHERJEE, P. K. et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4333–40, 2003.

MURATA, Y. et al. Dimethyl sulfoxide exposure facilitates phospholipid biosynthesis and cellular membrane proliferation in yeast cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 35, p. 33185–93, 2003.

45

NEGRUTA, O. et al. Methylotrophic yeasts: diversity and methanol metabolism. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 4, p. 5369-75, 2010

NETIKOVA, L.; BOGUSCH, P.; HENEBERG, P. Czech ethanol-free propolis extract displays inhibitory activity against a broad spectrum of bacterial and fungal pathogens. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 9, p. M1421-9, 2013.

NICK, J. A; LEUNG, C. T.; LOEWUS, F. A. Isolation and identification of erythroascorbic acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Lypomyces starkeyi*. **Plant Science**, v. 46, n. 3, p. 181-7, 1986.

NOTMAN, R. et al. The permeability enhancing mechanism of DMSO in ceramide bilayers simulated by molecular dynamics. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 6, p. 2056–68, 2007.

OTZEN, C. et al. *Candida albicans* utilizes a modified β -oxidation pathway for the degradation of toxic propionil-CoA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 12, p. 8151-69, 2014.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–63, 2007.

PRONK, J. T.; STEENSMAYS, H. Y; VAN, J. P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 12, n. 16, p.1607-33, 1996.

RAMOS, F. et al. Mutations affecting the enzymes involved in the utilization of 4-aminobutyric acid as nitrogen source by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Biochemistry**, v. 149, n. 2, p. 401-4, 1985.

RANDHAWA, M. A. Dimethyl sulfoxide (DMSO) inhibits the germination of *Candida albicans* and the arthrospores of *Trichophyton mentagrophytes*. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 49, n. 2, p. 125-8, 2008.

46

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. et al. Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2513-7, 2001.

ROZPEDOWSKA, E. et al. *Candida albicans* – a pre-whole genome duplication yeast – is predominantly aerobic and a poor ethanolproducer. **FEMS Yeast Research**, v. 11, p. 285-91, 2011.

RUY, F; VERCESI, A. E. Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 38, n. 2, p. 129-35, 2006.

SADOWSKA-BARTOSZ, I. et al. Dimethyl sulfoxide induces oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 8, p. 820-30, 2013.

SANDAI, D. et al. The evolutionary rewiring of ubiquitination targets has reprogrammed the regulation of carbon assimilation in the pathogenic yeast *Candida albicans*. **mBio**, v. 3, n. 6, p. e00495-12, 2012.

SELOW, M. L. C. et al. Growing *Candida albicans* biofilms on paper support and dynamic conditions. **Mycopathologia** v. 180, p. 27–33, 2015.

SETIADI, E. R. et al. Transcriptional Response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. **Journal of Molecular Biology**, v. 361, n. 3, p. 399-411, 2006.

SIGMA-ALDRICH (2016). Fundamental techniques in cell culture, laboratory handbook -third edition. Disponível em: https://www.phe-culturecollections.org.uk/ media/101902/fundamental-techniques-in-cell-culture-3rd-edition.pdf> Acesso em: 06/07/2017.

SIKKEMA, J.; de BONT, J. A.; POOLMAN, P. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022–8, 1994.

SMART, K. F. et al. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography– mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 5, n. 10, p. 1709-29 ,2010.

STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v. 62, n. 3, p. 247-69, 2003.

SUM, A. K.; de PABLO, J. J. Molecular simulation study on the influence of dimethylsulfoxide on the structure of phospholipid bilayers. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 6, p. 3636–45, 2003.

SUNDARAM, A.; GRANT, C. M. Oxidant-specific regulation of protein synthesis in *Candida albicans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 67, p. 15–23, 2014.

SYNNOTT, J. M. et al. Regulation of the hypoxic response in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 11, p. 1734-46, 2010.

SZKOPINSKA, A. Ubiquinone. Biosynthesis of quinone ring and its isoprenoid side chain. Intracellular localization. **Acta Biochimica Polonica**, v. 47, n. 2, p. 469–80, 2000.

TRISTAM-NAGLE, S. et al. DMSO produces a new subgel phase in DPPC: DSC and X-ray diffraction study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1369, p. 19–33, 1998.

TURUNEN, M.; OLSSONC, J.; DALLNER, G. Metabolism and function of coenzyme Q. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1660, n. 1-2, p. 171–99, 2004.

UENO, Y. et al. Hyphae formation of *Candida albicans* is regulated by polyamines. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 890-2, 2004.

VERDUYN, C. et al. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, v. 8, n. 7, p. 501-17, 1992.

VILLAS-BOAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 36, ano IX, p. 58-69, 2006.

WANG, L. et al. Mitochondrial respiratory chain inhibitors involved in ROS production induced by acute high concentrations of iodite and the effects of SOD as a protective factor. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1-14, 2015.

YEE, B.; TSUYUMU, S.; ADAMS, B. G. Biological effects of dimethyl sulfoxide on yeast. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 49, n. 5, p. 1336-42, 1972.

YU, Z. W.; QUINN, P. J. Dimethyl sulphoxide: a review of applications in cell biology. **Bioscience Reports**, v. 14, n. 6, p. 259-81, 1994.

YU, Z. W.; QUINN, P. J. The effect of dimethyl sulphoxide on the structure and phase behavior of palmitoleoylphosphatidylethanolamine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1509, n. 1-2, p. 440–50, 2000.

YURIMOTO, H.; OKU, M.; SAKAI, Y. Yeast methylotrophy: metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis. **International Journal of Microbiology**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

ZHANG, L. et al. The transcriptional control machinery as well as the cell wall integrity and its regulation are involved in the detoxification of the organic solvent dimethyl sulfoxide in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 2, p. 200–18, 2013.

ZHANG, W. et al. Microarray analyses of the metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* to organic solvent dimethyl sulfoxide. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 57–69, 2003.